

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2000-504569  
(P2000-504569A)

(43)公表日 平成12年4月18日(2000.4.18)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 2 3 J 3/12		A 2 3 J 3/12	
	1/04	1/04	
	1/06	1/06	
A 2 3 L 3/37		A 2 3 L 3/37	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21)出願番号 特願平9-528157  
(86) (22)出願日 平成9年2月5日(1997.2.5)  
(85)翻訳文提出日 平成10年8月7日(1998.8.7)  
(86)国際出願番号 PCT/EP97/00547  
(87)国際公開番号 WO97/28698  
(87)国際公開日 平成9年8月14日(1997.8.14)  
(31)優先権主張番号 96200309.1  
(32)優先日 平成8年2月9日(1996.2.9)  
(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (EP)

(71)出願人 ソシエテ デ プロデュイ ネットスル ソ  
シエテ アノニム  
スイス国 シーエィチー1800 プベイ, ケ  
ース ポスタル 353  
(72)発明者 ジャン, アルフレッド  
フランス国 エフー74500 ピュブリエ,  
ルード ド ベイードーキャボ  
(72)発明者 ルンドヘイム, ロルブ  
ノルウェー国 エヌー7010 トロンドヘイ  
ム, グリタ 2, デプト. オブ エコート  
キシコロジイ, アルフォルスク  
(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 氷結晶生長阻害剤

(57)【要約】

氷結晶生長阻害剤およびこのような剤の抽出方法が記載される。本方法によれば、*Zoarces viviparus*の血液を抽出し、冷却し、氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarces viviparus*血清を構成する上澄を集め、冷凍する。剤を食品の製造に使用する方法も開示される。

## 【特許請求の範囲】

1. *Zoarces viviparus* 血清を集め、血清タン白を単離し、タン白をゲル濾過により分離し、次いで1°～1.8℃の熱ヒステリシスを有するタン白画分を単離する方法により得ることができる、4～5.5KDaの分子量を有する氷結晶生長阻害剤。

2. 1.3°～1.5℃の熱ヒステリシスを有する、請求項1記載の氷結晶生長阻害剤。

3. 氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarces viviparus* 血清を調製する、氷結晶生長阻害剤抽出物の製造方法。

4. - *Zoarces viviparus* 血液を抽出し、  
- 冷却し、  
- 氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarces viviparus* 血清を構成する上澄を集め、  
- 一次に上澄を冷凍する、  
請求項3記載の方法。

5. 請求項1または2に記載の*Zoarces viviparus* から抽出し、または請求項3または4に記載の方法により得た少なくとも1種の氷結晶生長阻害剤を食品に添加する、氷結晶の大きさの減縮方法。

6. 0.01～10%の氷結晶生長阻害剤を添加する、請求項5記載の方法。

7. 少なくとも1種の氷結晶生長阻害剤を添加した食品を冷凍する、請求項5記載の方法。

8. 食品は-15°～-40℃の温度で冷凍する、請求項7記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 氷結晶生長阻害剤

本発明の主題は氷結晶生長阻害剤、このような剤の製造方法およびこれらの剤を食品の製造に使用する方法である。

「熱ヒステリシスタン白」と呼ばれる氷結晶生長阻害剤は氷結晶に結合し、これらの生長を低減する能力を有することが知られる（バイオフィジカル ジャーナル、1991年2月、p409～418）。これらの剤の2つの性質は証明されている、すなわちこれらは解凍温度に影響を与えずに溶液の明らかな凍結温度を下げる能力を有し、また氷結晶の再結晶化を阻害する能力も有する（クライオバイオロジー、25巻、1988、p55～60）。

さらに、これらの型の氷結晶生長阻害剤は特に北極および南極の或る種の魚類で実証された（FASEBジャーナル、1990年5月、p. 2460～2468）。これらの剤はタン白構造またはグリコタン白構造を有する。これらはこれらの魚類のプラズマまたは血清から単離され、次いで精製される。しかし、これらは他の組織にも存在する。

氷結晶生長阻害剤を使用して冷凍デザート、冷凍ペーストのような冷凍製品またはトマトのような生鮮品などの食品品質を改良することも知られる。DNAプラント テクノロジー コープは非常に低い温度条件下で生存しうる或る種の魚類または他の生物に見出すことができるものに似た氷結晶生長阻害剤である人工タン白を合成した（フード プロセッシング、1992年10月、p55）。

しかし、現在まで氷結晶生長阻害剤は特にノルウェーの沿岸およびバルト海沿岸に棲息する魚、ゾーシズ・ビビパルス（*Zoarces viviparus*）からは単離されていない。

本発明の目的は顕著な活性レベルを有し、例えば食品のような製品の冷凍または組織化に特に有利に使用しうる新規氷結晶生長阻害剤を供することである。

このため、本発明氷結晶生長阻害剤は*Zoarces viviparus*から抽出された分子量4～5.5 KDaを有する剤であり、これは*Zoarces*

*viviparus* 血清を収集し、血清タン白を単離し、タン白をゲル濾過に

より分離し、1～1.8℃の熱ヒステリシスを有するタン白画分を単離する方法により得ることができる。

好ましくは、これらの氷結晶生長阻害剤は1.3～1.5℃の熱ヒステリシスを示す。

意外なことに、これらの氷結晶生長阻害剤は例えばアイスクリーム、冷凍デザート、または冷凍ペーストのような食品の冷凍中氷結晶の寸法を効果的に低減し、食品に一層滑かなテクスチャーを付与できることが認められた。

以下の記載で、「結晶阻害剤」は「氷結晶生長阻害剤」の意味で使用する。

以下の記載で、「結晶の一般的寸法」は「主として見出される氷結晶の寸法」の意味で使用する。

以下の記載で、「等しい直径」は考えられる結晶の像として同じ表面積を有する円の直径」の意味で使用する。

本発明氷結晶生長阻害剤の抽出物の製造方法では、この剤を含有する*Zoarces viviparus*血清を調整する。

このため、*Zoarces viviparus*血液を抽出し、冷却し、氷結晶生長阻害剤含有*Zoarces viviparus*血清を構成する上澄を集め、次いで例えば上澄は凍結できる。

*Zoarces viviparus*血液は処理毛管により、特に例えばヘパリンナトリウムにより処理した毛管により抽出できる。

*Zoarces viviparus*血液は0～5℃、特に例えば血液に含まれるプロテアーゼおよびペプチダーゼの活性を阻害するために冷却できる。

氷結晶生長阻害剤含有*Zoarces viviparus*血清を構成する上澄は例えば0～5℃で5～15分、1000～5000gで*Zoarces viviparus*血液を遠心分離して集めることができる。このため、例えばC H-1227カルージュ・ジュネーブ、ジェーン通り、23、ヘレウス社が市販するヘレウス ミニヒュージ GL型遠心分離機は使用できる。

上澄は例えば-15° ～ -40℃の温度で冷凍できる。

本発明は氷結晶の大きさの低減方法にも関する。この方法では*Zoarces*

*viviparus* から抽出した少なくとも1種の氷結晶生長阻害剤を食品に添加する。特に0.01~10%の本発明氷結晶生長阻害剤を食品の製造中食品に添加できる。

こうして製造した食品は次に例えば冷凍できる。特に $-15^{\circ}$  ~  $-40^{\circ}\text{C}$ の温度で冷凍できる。

本発明結晶生長阻害剤は特に下記各種試験により測定した生化学的データおよび各種性質を通じて一層詳細に記載する。%は特記しない限り重量で示す。

#### Zoarcetes viviparus 血清の存在で20%蔗糖溶液から氷結晶の結晶化の証明

1mlの20%蔗糖溶液6試料を調整し、これに結晶阻害剤を含有する *Zoarcetes viviparus* 血清を各種濃度で添加する。

試料は冷蔵庫に保存後ライヘルト・ユング、ハルナルゼル、ハウプトストラッセ 219, AT-1170 ウィーンが市販するポリバル型顕微鏡下に置き、リンカム サイエントフィック、インストゥルメンツ社、エプソムダウンズ、メトロ センター、ウォーターフィールド、タドワース、サリー、KT205HT、英国が市販するリンカム型温度調整器により $-100^{\circ}\text{C}$ の温度に急速冷却する。

次に、試料は $-9^{\circ}\text{C}$ の温度に加熱し、こうして調整した試料に含まれる結晶の寸法は30~120分の間隔内でポリバル型顕微鏡下で観察する。

平行して1mlの20%蔗糖溶液を含有する対照試料を同じ条件下で調整する。

20%蔗糖溶液試料に添加する結晶阻害剤含有 *Zoarcetes viviparus* 血清の%は容量で示す。

試料1 : 1.3%の *Zoarcetes viviparus* 血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次に試料を上記のように調製する。 $-9^{\circ}\text{C}$ で60分後、結晶は $2\mu\text{m}$ 未満の代表的寸法を有する。経時的に結晶の寸法の変化は認められない。

試料2 : 1%の *Zoarcetes viviparus* 血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次に試料を上記のように調製する。 $-9^{\circ}\text{C}$ で30分後、結晶は $2\mu\text{m}$ 未満の代表的寸法を有する。経時的に結晶の寸法の変化は認められない。

試料3：0.1%の*Zoarcetes viviparus*血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。－9℃で30分後、結

晶は15 $\mu$ m未満の代表的寸法を有する。結晶の寸法は経時的にごく僅かだけ変化する。－9℃で120分後、結晶の代表的寸法は15 $\mu$ m未満のままであり、結晶ははっきりした角度のある形状を有する。

試料4：0.02%の*Zoarcetes viviparus*血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。結晶の寸法は－9℃で6分～90分間に僅かに変化する。結晶の代表的寸法は－9℃で90分後20 $\mu$ m未満である。結晶ははっきりした角度のある形状を有する。

試料5：0.013%の*Zoarcetes viviparus*血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。0.02%の*Zoarcetes viviparus*血清により調製した試料の場合と同じ変化が結晶の寸法に認められる。結晶の代表的寸法は－9℃で90分後20 $\mu$ mより大きい。結晶は僅かに円い角度の形状を有する。

試料6：0.01%の*Zoarcetes viviparus*血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。0.013%の*Zoarcetes viviparus*血清により調製した試料の場合より大きい変化が結晶の寸法に認められる。さらに、結晶は0.013%の*Zoarcetes viviparus*血清により調製した試料の場合より一層円い形状を有する。

結晶の代表的寸法は－9℃で90分後25 $\mu$ mより大きい。

対照試料：20%蔗糖溶液を上記のように調製するが、*Zoarcetes viviparus*血清はこれに添加しない。結晶は急速に大きく生長する。その形状は円く、－9℃で90分後、結晶の代表的寸法は25 $\mu$ mより大きい。

こうして、1.3～0.013%濃度で*Zoarcetes viviparus*血清を20%蔗糖溶液に添加する場合、経時的にごく僅かだけその寸法が変化する比較的小さい氷結晶が顕微鏡下で観察される。

他方、非常に低濃度の*Zoarcetes viviparus*血清を20%蔗糖

溶液に添加する場合、氷結晶は一層急速に大きく生長する。

試料6と対照試料間では氷結晶の形状および寸法の変化にほとんど差が認められない限界がある。20%蔗糖溶液に含まれる *Zoarces viviparus* 血清濃度が0.01%~10%間である場合、結晶の形状は

血清を含有しない対照溶液の結晶の形状より一層はっきりした角度を有する。

#### 熱ヒステリシスの測定

この分析はクリフトン テクニカル フィジックス, P. O. ボックス, ハートフォード, 米国, ニューヨーク, 12830が市販するクリフトン ナノリッター オスモメータ型温度調整器およびライカA. G. フェルカウフスゲゼール シャフト, カナルストラッセ21, CH-8152 グラットブルグが市販するワイルド MZ8型立体顕微鏡により行なう。

このため、20ml 画分の *Zoarces viviparus* 血清試料を室温で集め、温度調整器に置いた容器に入れる。この容器は流動パラフィンを含有する。急速凍結後徐々に解凍する。結晶の解凍は立体顕微鏡により観察する。次に、残留する唯一の小結晶を安定化するためにこの解凍は緩慢にし、停止し、温度を記録する。この温度が解凍点である。次に穏かな冷却を行ない、結晶の大きさが生長を始める温度を記録する。この温度が見掛けの凍結点である。

次に熱ヒステリシス値を見掛け凍結点と解凍点間の差を計算することにより算定する。*Zoarces viviparus* 血清画分の熱ヒステリシス値は1.4℃であり、この値はこのような剤を含有する魚に対し高値に相当する。

#### *Zoarces viviparus* から抽出した氷結晶生長阻害剤の特徴

*Zoarces viviparus* から抽出した氷結晶生長阻害剤はクロマトグラフ分析ならびにポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離から特徴が分かる。

従ってクロマトグラフ分析は最初に行なう。このため、*Zoarces viviparus* 血清に含有される20mgのタン白は、ウォータズA. G., フォルケッツウィル, CHが市販するウォータズ519ポンプおよびDADウォータズ990検知器を備えたファーマシア バイオテックA. G., デューベンドル

フ、CHが市販するスプローズ12カラムで分離する。液体クロマトグラフィにより分離を行なうために、pH7.8の150mM炭酸アンモニウム緩衝液を0.5ml/分の流速で移動相として使用する。

クロマトグラフィにより溶離した画分を使用して、熱ヒステリシスの測定を試験「熱ヒステリシスの測定」に記載のように行なう。30～33分間に溶離する

画分は*Zoarces viviparus*氷結晶生長阻害剤を含有する事実がこうして証明される。これはこの画分で最高熱ヒステリシスが測定されるからである。

熱ヒステリシスにて活性であるこの画分は濃縮され、次にゲル電気泳動により分離される。この分離は100Vで100分、バイオーラッド、グラットブルグ、CHが市販する予め製造したゲル、レディゲルで、バイオーラッド、グラットブルグ、CHが市販するミニプロテイン11装置により行なう。

染色後、この画分に含まれるタン白の分子量はバイオーラッド、グラットブルグ、CHが市販する同じゲルで分離した26.6～1.4KDaの分子量標準範囲と比較して評価する。

熱ヒステリシスで活性の画分のタン白は4～5.5KDaの分子量を有することがこうして実証される。

#### *Zoarces viviparus* 血清に含まれる結晶形成阻害剤の活性に及ぼす熱の影響の研究

*Zoarces viviparus* 血清試料を2時間40℃、50℃、60℃、70℃および80℃に加熱し、次にこれらの試料の熱ヒステリシスを測定する。これらの各種試料の熱ヒステリシス値は室温に保存した*Zoarces viviparus* 血清試料の熱ヒステリシス値と比較する。

このため、手順は試験「熱ヒステリシスの測定」に記載のように行なう。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表Iに示す。



表 I

熱処理試料	熱ヒステリシス値 (°C)
対照試料, 20°C 2 時間処理	0. 2 3 2
試料, 40°C 2 時間処理	0. 2 0 8
試料, 50°C 2 時間処理	0. 1 8 6
試料, 60°C 2 時間処理	0. 2 0 4
試料, 70°C 2 時間処理	0. 1 9 2
試料, 80°C 2 時間処理	0. 2 0 4

こうして測定した熱ヒステリシス値は、*Zoarcetes viviparus* 血清に含まれる結晶阻害剤は非常に高い熱安定性を示すことを実証する。これは高温工程、特に殺菌工程を含む食品製造方法でこのような剤を使用する利点である。

#### 熱ヒステリシス値に及ぼす *Zoarcetes viviparus* 血清の濃度の影響の証明

*Zoarcetes viviparus* 血清試料を2回一蒸留水に希釈し、これらの試料の熱ヒステリシス値を試験「熱ヒステリシスの測定」に記載の方法で測定する。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表 II に示す。

表 II

2 回一蒸留水に希釈した試料	熱ヒステリシス値 (°C)
対照試料	0. 5 2 4
試料, 1 / 2 希釈	0. 2 7 6
試料, 1 / 4 希釈	0. 1 6 4
試料, 1 / 8 希釈	0. 0 9 4

こうして得た結果は熱ヒステリシス値が *Zoarcetes viviparus* 血清試料の濃度によることを証明する。この依存関係は直線ではない。

魚類血清に含まれる結晶形成阻害剤の活性の比較研究

熱ヒステリシスはニューファウンドランド沿岸に棲息する魚、ガズス・モーファ (*Gadus morhua*)、ノルウェー北部までの陸に囲まれた沿岸に棲息する魚、ポラキウス・ポラキウス (*Pollachius pollachius*)、ヨーロッパ沿岸および日本沿岸に棲息する魚、ゴビウス・フラベセンス (*Gobiusculus flavescens*)、北極およびノルウェー沿岸近くに棲息する魚、ミオキシセファラス・スコピウス (*Myoxocephalus scorpius*)、大西洋に棲息する魚、リパリス・リパリス (*Liparis liparis*) およびビスケイ湾およびノルウェー北部までに棲息する魚、スピナチア・スピナチア (*Spinachia spinachia*) から抽出した血清試料に対し測定する。これらの各種試料の熱ヒステリシス値は *Zoarces viviparus* 血清試料の熱ヒステリシス値と比較する。

すべての魚は冬期ノルウェーのフィヨルドで捕獲し、殺した後長くても3時間内にこれらの魚から抽出した血清試料を使用して熱ヒステリシス測定を行なった。

このため、試験「熱ヒステリシスの測定」に記載の方法で試験を行なう。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表 III に示す。

表 III

血清抽出試料	熱ヒステリシス値 (°C)
<i>Gadus morhua</i>	0
<i>Pollachius pollachius</i>	0
<i>Gobiusculus flavescens</i>	0.4
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	0.1
<i>Spinachia spinachia</i>	0.2
<i>Liparis liparis</i>	0.4
<i>Zoarces viviparus</i>	1.4

こうして測定した熱ヒステリシス値は *Zoarces viviparus* 血清に含まれる結晶阻害剤が同様の条件下で生存する他の魚の血清に含まれる結晶

阻害剤より活性が高いことを証明する。

Zoarces viviparus 血清を含有するアイスクリームの氷結晶の  
大きさの測定

Zoarces viviparus 血清を含有するアイスクリームの氷結晶の大きさを測定し、次にこれらの結果は同一条件下で、しかし Zoarces viviparus 血清を含有させずに製造したアイスクリームの氷結晶の大きさと比較する。

このため、 $-40^{\circ}\text{C}$ に保存した Zoarces viviparus 血清を 0.05% 含有するアイスクリームを使用する。 $1\text{ cm}^3$  部分をアイスクリームマスの中央から切り取り、 $-10^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に移す。

$3\text{ mm}^3$ のシリコーン脂肪、 $3\text{ mm}^3$ の1個のその部分および7滴の石油ベンジン含有試料を $-10^{\circ}\text{C}$ でシリコーンゴム管に調製する。管は両端を閉じ、その内容物はガラス棒により混合する。

試料は顕微鏡スライドに移し、第2顕微鏡スライドで被覆する。

こうして調製した試料は光学顕微鏡下に置き、その像はビデオスクリーンで見えるようにする。結晶の二元像標本をカラー インストゥルメント AG, ブラウエライストラッセ 10, CH-8610 ウステルが販売する PC-イメージ プログラムにより得る。このプログラムにより等しい直径で表わした結晶の大きさを測定する。

Zoarces viviparus 血清を含有しないアイスクリームを使用して上記のように製造した対照品の氷結晶の大きさを測定する。

Zoarces viviparus 血清を含有するアイスクリームの氷結晶の分布は寸法基準に基づいて対照品と比較する。

次に Zoarces viviparus 血清を含有するアイスクリーム (a) の氷結晶および対照 (b) の氷結晶の分布は寸法基準に基づいて表 IV に示す。

表IV

結晶の寸法 ( $\mu\text{m}$ )	(a) 内の分布	(b) 内の分布
0 - 10	1	0
10 - 20	162	50
20 - 30	192	132
30 - 40	116	128
40 - 50	50	76
50 - 60	14	27
60 - 70	12	12
70 - 80	0	4
80 - 90	3	0
90 - 100	0	0
100 - 110	0	0

表IVに示す結果から、*Zoarces viviparus* 血清を含有するアイスクリーム (a) には小寸法の結晶が大多数存在することが分かる。実際に、*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリーム (a) では、結晶は主として10～40  $\mu\text{m}$  の寸法範囲に分布するが、対照 (b) では、結晶は主として20～50  $\mu\text{m}$  の寸法範囲に分布することを証明できる。

さらに、すべての結晶に対する寸法値から、*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームの結晶の平均寸法を計算し、この値を対照の氷結晶の平均寸法と比較する。*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームの氷結晶の平均寸法は27.8  $\mu\text{m}$  であり、対照の氷結晶の平均寸法は33.8  $\mu\text{m}$  である。

#### 熱ショック後の *Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームの氷結晶の寸法測定

*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームおよび対照アイスクリームを36時間熱ショック処理する。熱ショックは試料を-4℃に加熱し、次に-20℃に冷却し、最後に-4℃～-20℃の温度範囲で加熱および冷却

す

る温度サイクルにある。

手順は次に上記試験に記載の方法で行なう。

*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームの氷結晶の分布  
は寸法標準に基づいて対照アイスクリームの氷結晶の分布と比較する。

*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリーム (c) の氷結晶  
の分布および対照 (d) の氷結晶の分布を寸法標準に基づいて下表Vに示す。

表V

結晶の寸法 ( $\mu\text{m}$ )	(c) 内の分布	(d) 内の分布
0 - 10	0	0
10 - 20	1	1
20 - 30	37	0
30 - 40	61	2
40 - 50	61	8
50 - 60	40	20
60 - 70	18	25
70 - 80	14	40
80 - 90	10	37
90 - 100	3	41
100 - 110	6	30
110 - 120	6	18
120 - 130	4	18
130 - 140	1	9
140 - 150	0	8
150 - 160	0	6
160 - 170	0	8
170 - 180	0	1
180 - 190	0	3
190 - 200	0	3

表Vに示す結果は、熱ショック後、結晶生長阻害剤を含有する *Zoarcetes viviparus* 血清添加アイスクリームの氷結晶の寸法は血清無添加アイスクリームの氷結晶の寸法より小さいことを証明する。

実際に、*Zoarcetes viviparus* 血清の存在でアイスクリームの氷結晶の76%の寸法は60  $\mu\text{m}$ 未満であるが、一方対照では、氷結晶の11%のみが60  $\mu\text{m}$ 未満の寸法である。

さらに、*Zoarcetes viviparus* 血清の存在で、アイスクリーム

の氷結晶の6%のみが100 $\mu$ mより大きい寸法であるが、一方対照では38%の結晶が100 $\mu$ mより寸法が大きい。

最後に、すべての結晶に対する寸法値から、*Zoarces viviparus* 血清を含有し、熱ショック処理したアイスクリームの氷結晶の平均寸法を計算する。次に、この値は対照の氷結晶の平均寸法と比較する。*Zoarces viviparus* 血清含有アイスクリームの氷結晶の平均寸法は50.8 $\mu$ mであり、対照の氷結晶の平均寸法は96.5 $\mu$ mである。

結晶生長阻害剤含有*Zoarces viviparus* 血清を添加し、次に熱ショック処理したアイスクリームでは氷結晶の再結晶が部分阻害される事実が従って証明される。

#### *Zoarces viviparus* 血清を添加した食品のテクスチャーの分析

食品のテクスチャーを分析するために、これを破壊するに要するエネルギーをテクスチャーアナライザー、特にインストロン社、コロネーションロード、ハイウィカム、ブックスHP123SY、英国が市販するインストロンフードテストングインストゥルメントにより測定する。

このため、その中心から採取した直径40mmの円盤の食品を円形トレーに置き、直径30mmの円形底部を有するピストンを食品の上部表面に押しつけ、その間破壊に必要なエネルギーを測定する。

結晶生長阻害剤を含有する*Zoarces viviparus* 血清抽出物1gを添加し、次に凍結および加熱した薄くスライスしたタラフィレーを破壊するのに必要なエネルギーを測定する。次にこれらの測定値は*Zoarces viviparus* 血清抽出物を添加しないが、凍結、次に加熱した薄くスライ

スしたタラフィレーで行なった測定値と比較する。

#### 比較例

従って、1gの*Zoarces viviparus* 血清抽出物を25gの水に混合し、この溶液を薄くスライスした1Kgのタラフィレーに添加する。全体を十分に混合し、次に40g部分に分割する。次に、これらの部分は-35℃で凍結する。

比較として、25 gの水を1 Kgの薄くスライスしたタラフィレーと混合し、次に40 gの部分に分割し、対照とする。これらの対照品も-35℃で凍結する。

これらの40 g部分および対照品はプラスチック袋に入れ、次にこれらは70℃の温度に加熱する。

次に、部分および対照品の破壊に必要なエネルギーを測定する。次に測定値を比較する。

Zoarcetes viviparus血清抽出物を添加した薄くスライスしたタラフィレーの破壊に必要なエネルギーは $10.9 \pm 0.3 \text{ J} / 100 \text{ g}$ であるが、一方Zoarcetes viviparus血清抽出物を添加しないタラフィレーの破壊に必要なエネルギーは $12 \pm 0.3 \text{ J} / 100 \text{ g}$ である。

これらの結果はZoarcetes viviparus血清抽出物を添加し、凍結した薄くスライスしたタラフィレーはZoarcetes viviparus血清抽出物を添加しないで凍結した薄くスライスしたタラフィレーより加熱後一層軟かいテクスチャーを有する事実を証明する。

#### 固体食品のテクスチャーの顕微鏡分析

テクスチャーの顕微鏡分析を行なうために、存在する氷結晶の寸法評価に冷凍顕微鏡を使用する。

このため、40 g部分のタラフィレーおよび対照品を上記比較例記載の方法で調製し、-35℃の温度でパルス空気冷凍機で凍結する。

次に、これらの冷凍40 g部分試料および冷凍対照品試料を冷凍顕微鏡下で観察してこれらの各種試料の氷結晶の寸法を評価し、比較する。

氷結晶生長阻害剤を含有するZoarcetes viviparus血清抽出物を添加し、次に冷凍した薄くスライスしたタラフィレーに含まれる氷結晶の寸法

は、Zoarcetes viviparus血清抽出物を添加しない薄くスライスした冷凍タラフィレーに含まれる氷結晶の寸法より小さい事実が証明される。

従ってZoarcetes viviparus血清抽出物の添加により、凍結中特に固体または繊維性食品で氷結晶の大きさの増加により生ずる損傷を回避でき



る。

次例は本発明結晶生長阻害剤を食品部門における工業的使用の説明として示す。下記例では、%は特記しない限り重量により示す。

例 1

結晶生長阻害剤を含有する *Zoarcis viviparus* 血清をアイスクリームの製造に使用する。

このため、92.3 g の脱脂粉乳、150 g の蔗糖、26.2 g のグルコースシラップおよび5 g の乳化剤を65℃で494 g の水に溶解する。

4 g のバニラフレーバおよび35%の脂肪を含有する228.5 g のクリームをそこに添加する。

この調製物はキンドラー マシーネン AG, ポストファッハ 297, CH-8021 チューリッヒが販売するラニエ型ホモジナイザーで、最初は140パールで、2回目は40パールの連続2回の操作で均質化する。

均質化した製品は83℃、30秒プレート交換機で殺菌する。

4℃に冷却し、この温度に12時間放置後0.05%の *Zoarcis viviparus* 血清を添加し、APVテクノロジー社、アクセル キールス ページュ 28-30, DK-8270, アーフス・ホブジャーグが販売するホイエルMF50型冷凍機で冷凍する。

起泡性テクスチャーを有するアイスクリームをこうして得る。

次にこのアイスクリームはパルス空気冷却セルで硬化させ、-35℃で貯蔵する。

-18℃でテンパリング後、このアイスクリームは滑かで、すべすべしたテクスチャーを有する。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 97/00547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 A23J3/12 A23J1/04 A23J1/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 A23J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 92 12722 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 6 August 1992 see page 9-10, line 30-31; claims 1,2,9-11,15 see page 15-23; claims 16,20,23-26 see page 15, line 26-34 see page 17, line 34 - page 18, line 25; table 1A see page 68; claims 30,33,36,37 --- -/-	1,3,5 1-5,7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 April 1997		16.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2210 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kanbier, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 97/00547

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FOOD TECHNOLOGY, vol. 47, no. 1, 1 January 1993, pages 82, 84-88, 90, XP000338468	1-5,7
A	FEENEY R E ET AL: "ANTIFREEZE PROTEINS: PROPERTIES, MECHANISM OF ACTION, AND POSSIBLE APPLICATIONS" see page 82, right-hand column see page 86, right-hand column, paragraph 4 see page 87, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 ---	8
Y	POLAR BIOLOGY, vol. 1, no. 2, 1982, pages 115-123, XP000575107	1-5,7
A	SCHNEPPENHEIM, THEEDE: "FREEZING-POINT DEPRESSING PEPTIDES AND GLYCOPROTEINS FROM ARCTIC-BOREAL AND ANTARCTIC FISH" see page 116, right-hand column; tables 1,3 see page 117, right-hand column, paragraph 3; table 4 see figure 6; table 6 ---	2
A	CANADIAN JOURNAL OF ZOOLOGY, vol. 66, no. 2, 1988, pages 2611-2617, XP000571714 DAVIES, HEW, FLETCHER: "fish antifreeze proteins: physiology and evolutionary biology" see figure 2; tables 2,3 ---	1-3
A	FOOD PROCESSING, 1992, page 55 XP000571336 SWIENTEK: "frozen foods with 'fresh' qualities" see page 55 -----	6-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 97/00547

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9212722 A	06-08-92	AU 659795 B	01-06-95
		AU 7335491 A	05-08-91
		EP 0511317 A	04-11-92
		JP 8009521 B	31-01-96
		JP 5503706 T	17-06-93
		US 5358931 A	25-10-94
		WO 9110361 A	25-07-91
-----			

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF  
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S  
Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD  
, RU, TJ, TM), AL, AU, BB, BG, BR  
, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS,  
JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, M  
G, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO  
, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ,  
VN